

**Ekstremofilne grzyby strzępkowe – źródło biomolekuł  
o potencjalnych zastosowaniach przemysłowych**

mgr inż. Weronika Śliżewska

dr hab. inż. Olga Marchut-Mikołajczyk, prof. uczelni

dr inż. Katarzyna Struszczyk-Świta

## Streszczenie

Ekstremofilne grzyby strzępkowe stanowią ważne źródło biocząsteczek o potencjalnych zastosowaniach przemysłowych. Dzięki mechanizmom adaptacyjnym, które pozwalają im rozwijać się w trudnych warunkach środowiskowych, są one w stanie produkować cząsteczki o zwiększonej stabilności, bioaktywności oraz o nowych właściwościach. Pomimo tych zalet, biomolekuły pochodzące od ekstremofilów są wciąż w dużej mierze niezbadane, zwłaszcza w przypadku grzybów ekstremofilnych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była charakterystyka grzybów strzępkowych pochodzących ze środowisk ekstremalnych oraz ocena możliwości przemysłowego wykorzystania produkowanych przez nie biocząsteczek, w tym enzymów hydrolitycznych, pigmentów i biosurfaktantów, ze szczególnym uwzględnieniem przemysłu spożywczego.

W niniejszej pracy przebadano 21 szczepów halofilnych i halotolerancyjnych grzybów strzępkowych wyizolowanych z gleb zasolonych w Polsce i we Włoszech, a także psychrofilny szczep *Aureobasidium pullulans* P8 wyizolowany z gleby antarktycznej. Halofile analizowano pod kątem tolerancji na zasolenie, produkcji zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych (ocena indeksu enzymatycznego), zdolności do produkcji biosurfaktantów (badania przesiewowe aktywności hemolitycznej, a następnie ocena właściwości emulgacyjnych wybranego szczepu) oraz bezpieczeństwa biologicznego poprzez badania przesiewowe na obecność wybranych mykotoksyn (metoda oparta na HPLC). Na podstawie obserwacji z testów halotolerancji, szczep halofilny *Aspergillus tubingensis* FF14 wybrano do badań nad produkcją pigmentów oraz ich szczegółową identyfikacją (UV-Vis oraz UHPLC-DAD-ESI-MS/MS), oceną właściwości antyoksydacyjnych (testy DPPH i FRAP) oraz optymalizacją warunków produkcji z zastosowaniem metod statystycznych (metoda Taguchiego). Psychrofilny *A. pullulans* P8 badano pod kątem produkcji biosurfaktantów w niskich temperaturach, co obejmowało ocenę właściwości emulgacyjnych surowych biosurfaktantów (aktywność emulgacyjna, indeks emulsji i zdolność do dyspersji oleju) oraz charakterystykę chemiczną (FTIR). Dla wybranych szczepów przeprowadzono sekwencjonowanie całego genomu; genomy złożono, zdeponowano i przeanalizowano w celu identyfikacji genów oraz szlaków biosyntezy związanych z produkcją zidentyfikowanych związków.

Uzyskane wyniki pozwalają na kompleksową charakterystykę ekstremofilnych grzybów strzępkowych oraz ich zdolności do produkcji bioaktywnych biocząsteczek w warunkach stresu środowiskowego. Badania przesiewowe grzybów halofilnych i halotolerancyjnych potwierdziły, że wszystkie szczepy charakteryzowały się tolerancją na podwyższone zasolenie. Wszystkie szczepy tolerowały stężenia do 10% NaCl, przy czym siedem z nich było zdolnych do wzrostu nawet w stężeniu 17,5% NaCl. Najczęściej obserwowanym optymalnym stężeniem wzrostu było 5% NaCl, co klasyfikowało te szczepy jako umiarkowanie halofilne. Ponadto wszystkie testowane szczepy halofilne przejawiały zdolność do produkcji co najmniej jednego zewnątrzkomórkowego enzymu hydrolitycznego w warunkach zasolenia. Spośród nich

*Ramularia mali* FF1 została uznana za najwydajniejszego producenta wielu enzymów, osiągającego najwyższy indeks enzymatyczny wynoszący 10,67 dla aktywności pektynolitycznej. Badania przesiewowe biosurfaktantów potwierdziły aktywność hemolityczną u 14 szczepów przy 5% NaCl, przy czym jedynie 4 szczepy wykazały wyniki pozytywne przy 10% NaCl. *Acremonium sclerotigenum* FF3 wyróżniał się najwyższą aktywność przy wyższych stężeniach soli, a dalsze analizy potwierdziły jego właściwości emulgujące. Badania przesiewowe mykotoksyn wskazały na ograniczoną produkcję analizowanych związków, przy czym ochratoksynę A wykryto wyłącznie dla szczepu *Penicillium canescens* S10.

Na podstawie obserwacji poczynionych podczas badań przesiewowych przeprowadzono dalsze badania nad produkcją pigmentu w wybranym szczepie halofilnym *A. tubingensis* FF14, który wykazał pigmentację wewnątrzkomórkową w warunkach zasolenia. Wyizolowane pigmenty wewnątrzkomórkowe zidentyfikowano jako neoksantynę, wiolaksantynę i anteraksantynę. Potwierdzono aktywność antyoksydacyjną mieszaniny pigmentów, jednak była ona niższa niż w przypadku wzorca  $\beta$ -karotenu. Warunki produkcji zoptymalizowano z powodzeniem przy użyciu metod statystycznych, co doprowadziło do zwiększenia wydajności pigmentu. Adnotacja genomu i analiza porównawcza wykazały obecność biosyntetycznych klastrów genów związanych z biosyntezą karotenoidów, co potwierdza identyfikację pigmentów. Nie zidentyfikowano jednak genów ani szlaków bezpośrednio związanych z ksantofilami, co wskazuje na konieczność dalszych analiz transkryptomicznych.

Równolegle do badań nad grzybami halofilnymi zbadano również grzyby psychrofilne jako kolejną grupę ekstremofili zdolnych do produkcji związków powierzchniowo czynnych. Psychrofilny *A. pullulans* P8 wykazał zdolność do produkcji biosurfaktantów aktywnych w niskich temperaturach. Właściwości produkcyjne i emulgujące surowych biosurfaktantów potwierdzono w niskich temperaturach, uzyskując indeks emulsji dla oleju rzepakowego na poziomie do 34,11% w temperaturze 10°C. Ponadto zaobserwowano zwiększoną zdolność w testach „oil displacement” oraz „drop-collapse” w przypadku surowych biosurfaktantów uzyskanych z hodowli prowadzonych w niższych temperaturach. Charakterystyka wytworzonych biosurfaktantów wskazała na ich glikolipidowy charakter oraz podobieństwo strukturalne do liamocyn i lipidów polioliowych. Dodatkowo analiza genomu ujawniła obecność genów i biosyntetyczne klastry genów związanych z biosyntezą liamocyn, co potwierdza uzyskane wyniki eksperymentalne.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska dowodzi, że ekstremofilne grzyby strzępkowe stanowią bardzo zróżnicowane i obiecujące źródło biocząsteczek o znaczeniu przemysłowym. Przeprowadzone badania poszerzają aktualną wiedzę na temat potencjału metabolicznego, zdolności adaptacyjnych oraz znaczenia biotechnologicznego tych mikroorganizmów. Co więcej, stanowią one solidną podstawę naukową dla dalszych badań oraz przyszłych zastosowań ekstremofilnych grzybów strzępkowych w innowacyjnych procesach przemysłowych i biotechnologicznych.

Słowa kluczowe: ekstremofile, grzyby strzępkowe, biomolekuły, enzymy